

B40



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 101 35 053 A 1**

5 Int. Cl.⁷:
C 12 P 13/04
C 12 P 13/08

21 Aktenzeichen: 101 35 053.8
22 Anmeldetag: 18. 7. 2001
43 Offenlegungstag: 6. 2. 2003

DE 101 35 053 A 1

71 Anmelder:
Degussa AG, 40474 Düsseldorf, DE

72 Erfinder:
Rieping, Mechthild, Dr., 33619 Bielefeld, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, indem man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert,
b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure.

BEST AVAILABLE COPY

DE 101 35 053 A 1

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phhL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, verstärkt wird (werden).

Stand der Technik

[0002] L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

[0003] Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere *Escherichia coli* (E. coli) und *Serratia marcescens*, herzustellen. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z. B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

[0004] Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Threonin produzieren.

[0005] Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

[0006] Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

[0007] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens eine oder mehrere der für die Gene kodierende(n) malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, Nukleotidsequenz(en) verstärkt

wird (werden).

[0008] Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

[0009] Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0010] Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

[0011] Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, verstärkt wird (werden),
- b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100%) davon im Produkt verbleiben.

[0012] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* und *Serratia*. Die Gattungen *Escherichia* und *Serratia* werden bevorzugt. Bei der Gattung *Escherichia* ist insbesondere die Art *Escherichia coli* und bei der Gattung *Serratia* insbesondere die Art *Serratia marcescens* zu nennen.

[0013] Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Escherichia*, insbesondere der Art *Escherichia coli* sind beispielsweise
Escherichia coli TF427
Escherichia coli H4578
Escherichia coli KY10935
Escherichia coli VNIIGenetika MG442
Escherichia coli VNIIGenetika M1
Escherichia coli VNIIGenetika 472T23
Escherichia coli BKIIM B-3996

Escherichia coli kat 13

Escherichia coli KCCM-10132.

[0014] Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Serratia*, insbesondere der Art *Serratia marcescens* sind beispielsweise

Serratia marcescens HNr21

Serratia marcescens TLr156

Serratia marcescens T2000.

[0015] L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobornsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

[0016] Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Verstärkung, insbesondere Überexpression mindestens eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

[0017] Die Nukleotidsequenzen der Gene von *Escherichia coli* gehören zum Stand der Technik und können ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453-1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von *Escherichia coli* entnommen werden.

malE-Gen:

Bezeichnung: Periplasmatisches Maltose-Bindeprotein

Referenz: Duplay et al., Journal of Biological Chemistry 259(16): 10606-13 (1984)

Accession No.: AE000476

Alternativer Gennamen: malB

phoA-Gen:

Bezeichnung: Alkalische Phosphatase

EC-Nr.: 3.1.3.1

Referenz: Berg; Journal of Bacteriology 146(2), 660-7 (1981)

Accession No.: AE000145

phoB-Gen:

5 Bezeichnung: Positiver Regulator des pho Regulons, Zwei-Komponenten System

Referenz: Makino et al.; Journal of Molecular Biology 190(1), 37-44 (1986)

Accession No.: AE000146

10 Alternative Gennamen: phoRc, phoT

phoR-Gen:

Bezeichnung: Positives und negatives Sensorprotein des pho Regulons, Sensor des Zwei-Komponenten Systems

EC-Nr.: 2.7.3.-

15 Referenz: Makino et al.; Journal of Molecular Biology 192(3), 549-56 (1986)

Accession No.: AE000146

Alternative Gennamen: R1pho, nmpB, phoR1

phoE-Gen:

20 Bezeichnung: Protein der äusseren Zellmembran E (E, Ic, NmpAB)

Referenz: Overbeeke et al.; Journal of Molecular Biology 163(4), 513-32 (1983)

Accession No.: AE000132

25 Alternativer Gennamen: ompE

phnC-Gen:

Bezeichnung: ATP-Bindedomäne des Phosphonat Transporters

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnD-Gen:

Bezeichnung: Periplasmatisches Bindeprotein des Phosphonat Transporters

35 Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

Alternativer Gennamen: psiD

phnE-Gen:

40 Bezeichnung: Integrale Membrankomponente des Phosphonat Transporters

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

45 phnF-Gen:

Bezeichnung: Putativer Regulator des Phosphonat Transporters

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnG-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-einheit (Phosphonat Metabolismus)

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnJ-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-einheit (Phosphonat Metabolismus)

60 Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnK-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-einheit (Phosphonat Metabolismus)

65 Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8), 2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnL-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-
einheit (Phosphonat Metabolismus)

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),
2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnM-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-
einheit (Phosphonat Metabolismus)

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),
2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnN-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-
einheit (Phosphonat Metabolismus)

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),
2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnO-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-
einheit (Phosphonat Metabolismus)

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),
2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

phnP-Gen:

Bezeichnung: Kohlenstoff-Phosphor Lyase Komplex Unter-
einheit (Phosphonat Metabolismus)

Referenz: Makino et al. Journal of Bacteriology, 173(8),
2665-12 (1991)

Accession No.: AE000482

pykF-Gen:

Bezeichnung: Pyruvat Kinase I (ehemals F), Fructose stimu-
liert

EC-Nr.: 2.7.1.40

Referenz: Ponce et al.; Journal of Bacteriology 177(19):
5719-22 (1995)

Accession No.: AE000262

pfkA-Gen:

Bezeichnung: 6-Phosphofructokinase II; Suppressor von
pfkA

Referenz: Daldal; Gene 28(3), 337-42 (1984)

Accession No.: AE000267

eda-Gen:

Bezeichnung: 2-Keto-3-Desoxygluconat 6-Phosphat Aldo-
lase und 2-Keto-4-Hydroxyglutarat Aldolase (Entner-Dou-
doroff Aldolase)

EC-Nr.: 4.1.2.14 4.1.3.16

Referenz: Carter et al.; Gene 130(1), 155-6 (1993)

Accession No.: AE000279

Alternative Gennamen: kga, kdgA

talB-Gen:

Bezeichnung: Transaldolase B

EC-Nr.: 2.2.1.2

Referenz: Sprenger et al.; Journal of Bacteriology 177(20),
5930-6 (1995)

Accession No.: AE000111

rpiB-Gen:

Bezeichnung: Ribose 5-Phosphat Isomerase B

Referenz: Sorensen und Hove-Jensen; Journal of Bacterio-
logy 178(4), 1003-11 (1996)

Accession No.: AE000482

zwf-Gen:

Bezeichnung: Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Zwi-
schenferment)

EC-Nr.: 1.1.1.49

Referenz: Rowley und Wolf; Journal of Bacteriology
173(3), 968-77 (1991)

Accession No.: AE000279

mopA-Gen:

Bezeichnung: GroEL, Chaperon Hsp60, Peptid-abhängig
Referenz: Chandrasekhar et al.; Journal of Biological Che-
mistry 261(26), 12414-9 (1986)

5 Accession No.: AE000487

Alternative Gennamen: groE, groEL, bdh, tabB; 60 kD cha-
peronin (CPN60)

pstA-Gen:

Bezeichnung: Hoch-affines Phosphat Transport System

10 Referenz: Surin et al.; Journal of Bacteriology 161(1),
189-98 (1985)

Amemura et al.; Journal of Molecular Biology 184(2),
241-50 (1985)

Accession No.: AE000449

15 Alternative Gennamen: R2pho, phoR2b, phoT

pstB-Gen:

Bezeichnung: ATP-Bindekomponente des hoch-affinen
Phosphat Transport Systems

Referenz: Surin et al.; Journal of Bacteriology 161(1),
189-98 (1985)

Amemura et al.; Journal of Molecular Biology 184(2),
241-50 (1985)

Accession No.: AE000449

Alternativer Genname: phoT

25 pstC-Gen:

Bezeichnung: Hoch-affines Phosphat Transport System, Cy-
toplasmamembran Komponente

Referenz: Surin et al.; Journal of Bacteriology 161(1),
189-98 (1985)

30 Accession No.: AE000449

Alternativer Genname: phoT

pstS-Gen:

Bezeichnung: Hoch-affines Phosphat Transport System; Pe-
riplasmatisches Phosphatbindeprotein

35 Referenz: Surin et al., Journal of Bacteriology 157, 772-8
(1984);

Magota et al., Journal of Bacteriology 157, 909-17 (1984)

Accession No.: AE000449

Alternative Gennamen: R2pho, nmpA, phoR2a, phoS

40 ugxB-Gen:

Bezeichnung: sn-Glycerin-3-Phosphat Transport System;
Periplasmatisches Bindepotein

Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),
767-75 (1988)

45 Accession No.: AE000421

Alternative Gennamen: psiB, psiC,

ugpA-Gen:

Bezeichnung: sn-Glycerin-3-Phosphat Transport System,
Integriertes Membran Protein

50 Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),
767-75 (1988)

Accession No.: AE000421

Alternative Gennamen: psiB, psiC

ugpE-Gen:

55 Bezeichnung: sn-Glycerin-3-Phosphat Transport System,
Integriertes Membran Protein

Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),
767-75 (1988)

Accession No.: AE000421

60 ugxC-Gen:

Bezeichnung: ATP-Bindekomponente des sn-Glycerin-3-
Phosphat Transport Systems

Referenz: Overduin et al.; Molecular Microbiology 2(6),
767-75 (1988)

65 Accession No.: AE000421

ugpQ-Gen:

Bezeichnung: Glycerinphosphodiester Phosphodiesterase,
cytosolisch

EC-Nr.: 3.1.4.46
Referenz: Kasahara et al.; Nucleic Acids Research 17(7), 2854 (1989)
Accession No.: AE000421
dnaK-Gen:
Bezeichnung: Chaperon Hsp70; DNA Biosynthese; autoreguliertes Hitzeschockprotein
Referenz: Bardwell und Craig; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 81(3), 848-52 (1984)
Accession No.: AE000112
Alternative Gennamen: gro, groP, groPAB, groPC, groPF, grpC, grpF, seg
dnaJ-Gen:
Bezeichnung: Chaperon; Hitzeschockprotein
Referenz: Ohki et al.; Journal of Biological Chemistry 261(4), 1778-81 (1986)
Accession No.: AE000112
Alternative Gennamen: groP, grpC
clpB-Gen:
Bezeichnung: Hitzeschockprotein (caseinolytische Protease)
EC-Nr.: 1.17.4.-3.4.21.-
Referenz: Kitagawa et al.; Journal of Bacteriology 173(14), 4247-53 (1991)
Accession No.: AE000345
rpoE-Gen:
Bezeichnung: RNA Polymerase, Sigma-E Faktor; Hitzeschock und oxidativer Stress
Referenz: Raina et al.; EMBO Journal 14 (5), 1043-55 (1995)
Accession No.: AE000343
rseA-Gen:
Bezeichnung: sigma-E Faktor, negativer Regulator (Membranprotein Regulator der σ E Aktivität)
Referenz: Missiakas et al.; Molecular Microbiology 24(2), 355-71 (1997)
Accession No.: AE000343
Alternative Gennamen: mclA
rseC-Gen:
Bezeichnung: sigma-E Faktor, globaler Regulator
Referenz: Missiakas et al.; Molecular Microbiology 24(2), 355-71 (1997)
Accession No.: AE000343
htpG-Gen:
Bezeichnung: Chaperon Hsp90, Hitzeschockprotein C 62.5
Referenz: Spence und Georgopoulos; Journal of Biological Chemistry 264(8), 4398-403 (1989)
Accession No.: AE000153
sodA-Gen:
Bezeichnung: Superoxiddismutase
Referenz: Touati; Journal of Bacteriology 155(3): 078-87 (1983)
Accession No.: AE000465
ompF-Gen:
Bezeichnung: Äusseres Membranprotein 1a (Ia; b; F)
Referenz: Inokuchi et al.; Nucleic Acids Research 10(21), 6957-68 (1982)
Accession No.: AE000195
Alternative Gennamen: cmfB, coa, cry, tofF
ompC-Gen:
Bezeichnung: Äusseres Membranprotein 1b (Ib; c)
Referenz: Mizuno et al.; Journal of Biological Chemistry 258(11), 6932-40 (1983)
Accession No.: AE000310
Alternative Gennamen: meoR, par
sucA-Gen:
Bezeichnung: 2-Ketoglutarat Dehydrogenase (Decarboxylase Untereinheit)

EC-Nr.: 1.2.4.2
Referenz: Darlison et al.; European Journal of Biochemistry 141(2), 351-9 (1984)
Accession No.: AE000175
5 Alternative Gennamen: lys, met
sucB-Gen:
Bezeichnung: 2-Ketoglutarat Dehydrogenase (Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit)
EC-Nr.: 2.3.1.61
10 Referenz: Spencer et al.; European Journal of Biochemistry 141(2), 361-74 (1984)
Accession No.: AE000175
Alternative Gennamen: lys, met
sucC-Gen:
Bezeichnung: Succinyl-CoA Synthetase, β -Untereinheit
EC-Nr. 6.2.1.5
Referenz: Buck et al.; Biochemistry 24(22), 6245-52 (1985)
Accession No.: AE000176
sucD-Gen:
Bezeichnung: Succinyl-CoA Synthetase, α -Untereinheit
EC-Nr. 6.2.1.5
Referenz: Buck et al.; Biochemistry 24(22), 6245-52 (1985)
Accession No.: AE000176
aspA-Gen:
25 Bezeichnung: Aspartat Ammonium-Lyase (Aspartase)
EC-Nr.: 4.3.1.1
Referenz: Takagi et al.; Nucleic Acids Research 13(6), 2063-74 (1985)
Accession No.: AE000486
30 gltA-Gen:
Bezeichnung: Citratsynthase
EC-Nr.: 4.1.3.7
Referenz: Spencer und Guest, Journal of Bacteriology 151(2), 542-52 (1982)
Accession No.: AE000175
Alternative Gennamen: gluT, icdB
sdhB-Gen:
Bezeichnung: Succinatdehydrogenase
EC-Nr.: 1.3.99.1
40 Referenz: Darlison und Guest, Biochemical Journal 223(2), 507-17 (1984)
Accession No.: AE000175
aceB-Gen:
Bezeichnung: Malatsynthase A
45 EC-Nr.: 4.1.3.2
Referenz: Byrne et al.; Nucleic Acids Research 16(19), 9342 (1988)
Accession No.: AE000474
Alternativer Gennamen: mas
50 aceK-Gen:
Bezeichnung: Isocitratdehydrogenase Kinase/Phosphatase
EC-Nr.: 2.7.1.116
Referenz: Cortay et al.; Journal of Bacteriology 170(1), 89-97 (1988)
55 Klumpp et al.; Journal of Bacteriology 170(6), 2763-9 (1988)
Accession No.: AE000474
[0018] Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.
60
[0019] Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele der Gene verwendet werden, die sich aus

der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen ("sense mutations") ergeben. [0020] Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen Eigenschaften der Proteine erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

[0021] Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0022] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993)), in PCT/US 97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0023] In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z. B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102, 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, oder dafür codierende Nucleotidsequenzen trägt.

[0024] Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression der jeweiligen Gene betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171, 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

[0025] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB,

sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat zu verstärken.

[0026] So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4.278.765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-198 31 609),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231: 332 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31: 279-283 (1984)),
- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (DE 100 34 833.5),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- das für den Threoninexport kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (DE 100 26 494.8), und
- das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0027] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology 169, 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E. C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Vogel et al., Archives in Microbiology 149, 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA),
- das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (Medina et al. (Journal of Bacteriology 172, 7151-7156 (1990))),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (Grabau und Cronan (Nucleic Acids Research 14(13), 5449-5460 (1986)),
- das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-

Gen (Matsuoka und McFadden, Journal of Bacteriology 170, 4528-4536 (1988)),

- das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (Hosono et al., Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 59, 256-251 (1995)), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist, und

- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (Jahreis et al., Molecular and General Genetics 226, 332-336 (1991)), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist.

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

[0028] Der Begriff "Abschwächung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0029] Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

[0030] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung eines oder mehrerer der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

[0031] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch-Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0032] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

[0033] Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet wer-

den. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0034] Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0035] Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugeführt werden.

[0036] Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasgemischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0037] Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninyhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

[0038] Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, **dadurch gekennzeichnet**, daß man folgende Schritte durchführt:

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK,

oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert,

b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und

c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100) davon im Produkt verbleiben.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpB, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, kodiert (kodieren) erhöht.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die regulatorischen-und/oder katalytischen Eigenschaften der Polypeptide (Proteine) verbessert oder erhöht, für die die Polynukleotide malE, phoA, phoB, phoR, phoE, phnC, phnD, phnE, phnF, phnG, phnJ, phnK, phnL, phnM, phnN, phnO, phnP, pykF, pfkB, eda, talB, rpiB, zwf, mopA, pstA, pstB, pstC, pstS, ugpB, ugpA, ugpE, ugpC, ugpQ, dnaK, dnaJ, clpB, rpoE, rseA, rseC, htpG, sodA, ompF, ompC, sucA, sucB, sucC, sucD, aspA, gltA, sdhB, aceB und aceK, kodieren.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,

6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,

6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,

6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,

6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,

6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,

6.7 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,

6.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC, und

6.9 das für den Threoninexport kodierende thrE-Gen

6.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,

7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,

7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa,

7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,

7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,

7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,

7.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen,

7.8 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,

7.9 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,

abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.